

## 放線菌で機能する有用な発現ベクターの構築

著者	松本 雅子
発行年	2016
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2015
報告番号	12102甲第7766号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2241/00143464">http://hdl.handle.net/2241/00143464</a>

氏名	松本 雅子		
学位の種類	博 士 ( 学 術 )		
学位記番号	博 甲 第 7766 号		
学位授与年月日	平成 28年 3月 25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	放線菌で機能する有用な発現ベクターの構築		
主査	筑波大学教授	農学博士	小林達彦
副査	筑波大学教授	博士 (農学)	中村 顕
副査	筑波大学教授	博士 (工学)	野村 暢彦
副査	筑波大学准教授	博士 (工学)	橋本 義輝

## 論 文 の 要 旨

*Streptomyces* 属放線菌は二次代謝産物として抗生物質や農薬、抗寄生虫剤などを生産することが知られている。さらに、多くの有用な酵素が *Streptomyces* 属から発見されており、中には工業的に応用されているものもある。一方、同じく放線菌に属する *Rhodococcus* 属は難分解性化合物を分解する能力が高く、環境浄化や有用物質生産に利用されている。タンパク質の異種発現には大腸菌を宿主として用いることが一般的であるが、放線菌由来の酵素の大腸菌での発現は容易でないため、放線菌の両属で各々機能する発現系の開発が望まれ、本研究は行われた。

まず、大腸菌と *Streptomyces* 属放線菌の両方で複製可能なシャトルベクターの構築を目指して以下の研究が行われた。*Rhodococcus rhodochrous* J1 菌のニトリル代謝酵素であるニトリラーゼ由来の誘導発現システム (*PnitA*-*NitR*) を組み込むことで開発した (*Streptomyces* 属で機能する) 誘導型高度発現ベクター pSH19 は *Streptomyces* 属のみでしか複製せず、プラスミドの構築に時間がかかることから、本ベクターを *Streptomyces*-*E. coli* シャトルベクターに改変した。即ち、大腸菌で機能するプラスミド複製起点および薬剤耐性遺伝子を pSH19 に連結して 6 種の pSH19 シャトルベクター (pEH19cF、pESH19cR、pESH19kF、pESH19kR、pESH19aF および pESH19aR) を構築後、形質転換した 5 種の大腸菌におけるプラスミドの安定性を評価した結果、プラスミド構築において大腸菌とプラスミドの組み合わせが重要であることが判明した。また、構築した pSH19 シャトルベクターのうち、pEH19cF、pESH19kF および pESH19aF にレポーター遺伝子を組み込み、*Streptomyces lividans* TK24 を形質転換した結果、培地への誘導剤添加時でのみ、目的タンパク質の発現および活性が確認された。

一方、*R. rhodocrous* J1 菌由来の高分子量型ニトリルヒドラーゼ（H-NHase）遺伝子プロモーターを利用し、*Rhodococcus* 属放線菌で機能する構成型発現系の開発を目指して以下の研究が行われた。まず H-NHase 遺伝子クラスター中の調節タンパク質遺伝子およびプロモーター領域を含む断片内にマルチクローニングサイトを付加し、*Rhodococcus-E. coli* シャトルベクターと連結して、構成型発現ベクター pREYH81 を構築した。pREYH81 に各種レポーター遺伝子として組み込み解析した結果、*Rhodococcus erythropolis* PR4 で全ての目的タンパク質の発現と酵素活性が検出されるとともに、4 種の *Rhodococcus* 属でカテコール 2,3-ジオキシゲナーゼの発現が確認された。

## 審 査 の 要 旨

生理活性物質を始めとする各種有用物質の生産菌として工業的に利用されている *Streptomyces* 属放線菌と、難分解性化合物分解能が高く、環境浄化のみならず有用物質生産にも利用されつつある *Rhodococcus* 属放線菌を対象とし、両属で各々働く発現系の開発が求められている。

本研究で開発した 6 種の *Streptomyces-E. coli* シャトルベクターを用いて形質転換した *Streptomyces* 属では培地への誘導剤添加時でのみ、目的タンパク質の発現および活性が見られ、有用な発現系であることが判明した。また、別途、開発に成功した *Rhodococcus-E. coli* シャトルベクターに関しても有用な実験ツールになり得ることが判明した。今後、有用タンパク質ならびに有用酵素反応産物の大量生成・取得への利用、放線菌の育種改良など、本発現系の幅広い応用が期待される。

以上のように、本研究の成果は、応用微生物学領域のみならず分子生物学領域においても大きく貢献するものと判定される。

平成 28 年 1 月 19 日、学位論文審査委員会において、審査専門委員全員の出席のもとに論文の審査および最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（学術）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。